

Manuela Sozo Cecchini

**EFEITO DO ÁCIDO FÓLICO E DA HOMOCISTEÍNA SOBRE
OS PROCESSOS DE PROLIFERAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO
CELULAR NO TELENCEFALO DE EMBRIÕES DE *GALLUS
DOMESTICUS***

Trabalho de conclusão de curso
apresentado ao curso de Ciências
Biológicas - Centro de Ciências
Biológicas – CCB, da Universidade
Federal de Santa Catarina – UFSC,
como requisito parcial para
obtenção do grau de Bacharel em
ciências biológicas.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Evelise
Maria Nazari

Florianópolis
2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Cecchini, Manuela Sozo

EFEITO DO ÁCIDO FÓLICO E DA HOMOCISTEÍNA SOBRE OS
PROCESSOS DE PROLIFERAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO CELULAR NO
TELENCEFALO DE EMBRIÕES DE GALLUS DOMESTICUS / Manuela Sozo
Cecchini ; orientadora, Evelise Maria Nazari -
Florianópolis, SC, 2013.

55 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
Biológicas. Graduação em Ciências Biológicas.

Inclui referências

1. Ciências Biológicas. 2. Folatos. 3. Sistema Nervoso
Central. 4. Embrião. 5. Desenvolvimento. I. Nazari,
Evelise Maria. II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

Manuela Sozo Cecchini

EFEITO DO ÁCIDO FÓLICO E DA HOMOCISTEÍNA SOBRE OS
PROCESSOS DE PROLIFERAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO CELULAR
NO TELENCEFALO DE EMBRIÕES DE *GALLUS DOMESTICUS*

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para
obtenção do Título de Bacharel em Ciências Biológicas, e aprovado em
sua forma final pelo Centro de Ciências Biológicas – CCB

Florianópolis, 11 de Junho de 2013

Banca Examinadora

Prof. Dra. Evelise Maria Nazari (UFSC)
Orientadora / Presidente

Prof. Dra. Kiev Resende Souza de Moura (UFSC)
Membro

Dra. Karoline Kobus
Membro

Prof. Dra. Cristine Maria Bressan (UFSC)
Suplente

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço aos meus pais, pelo incentivo, investimento e apoio incondicional para que eu chegasse até aqui. Vocês são meu maior exemplo!

À minha orientadora Evelise, pela oportunidade de estagiar em seu laboratório, por sua disponibilidade, orientação e dedicação como profissional.

À Karoline, pela disponibilidade e paciência em me ensinar sobre a parte prática dos experimentos, que muito ajudaram na realização deste trabalho.

À Eliane, Fabiana e Gilian, pelo auxílio nas imunos, e por me proporcionarem boas risadas.

Ao ‘povo’ dos camarões: Valquíria, Heloísa, Guilherme. Ao ‘povo’ do Zebrinha: Neide, e em especial à Luciane pela ajuda com a formatação e referências aos 45 minutos do segundo tempo. Obrigada a todos pelo companheirismo e pelos momentos de descontração.

Às duas amigas especiais que a graduação me deu: Aninha e Paulinha, vocês foram essenciais durante todo este percurso. Obrigada pelos almoços, pela convivência, pelos desabafos, pelas dúvidas compartilhadas e pelas conversas sempre muito produtivas.

Ao meu namorado Leandro, pelo auxílio na elaboração e edição das figuras, pela paciência, pelas palavras de incentivo e acima de tudo pelo bom humor!!

RESUMO

Micronutrientes são vitaminas e minerais obtidos da dieta, necessários para o crescimento, manutenção e reprodução dos indivíduos. O ácido fólico (AF) é uma vitamina do complexo B, que participa de importantes reações metabólicas, como a biossíntese de compostos essenciais. Sua deficiência está associada a elevados índices plasmáticos de homocisteína (Hcy), que ao se acumular intracelularmente, pode provocar defeitos de tubo neural (DTN). Neste estudo foi avaliado o efeito do AF e da Hcy sobre os processos de proliferação e diferenciação celular no telencéfalo de embriões de *gallus domesticus*. Para tal, ovos fertilizados de *G. domesticus* foram incubados a 38°C e a 65% de umidade, sendo os tratamentos realizados após 24 e 46 horas de incubação. Foram organizados grupos experimentais, como segue: controle - 50 µl salina (24 horas de incubação)+50 µl salina (46 horas de incubação); AF - 50 µl salina (24 horas de incubação)+0.5 µg AF (46 horas de incubação); Hcy - 50 µl salina (24 horas de incubação)+20 µmol Hcy (46 horas de incubação); AF+Hcy - 0.5 µg AF (24 horas de incubação)+20 µmol Hcy (46 horas de incubação). Após, os ovos foram selados com fita não tóxica e retornaram para a estufa, permanecendo até o sexto dia embrionário (E6), quando os embriões foram retirados dos ovos e preparados para as análises posteriores. Foram realizadas análises morfométricas das vesículas encefálicas e das camadas do telencéfalo (ependimária, manto e marginal). Técnicas de imuno-histoquímica foram utilizadas para avaliar a proliferação celular, diferenciação neuronal e glial, através dos anticorpos: anti-fosfohistona H3 (proliferação celular); anti-β tubulina III (diferenciação neuronal) e anti-GFAP (diferenciação glial). A morfometria da região cefálica demonstrou pouca variação entre os tratamentos realizados. Do mesmo modo, não foram observadas alterações na espessura das camadas do telencéfalo. Nos embriões tratados com Hcy verificou-se uma redução significativa da proliferação celular na camada ependimária. Na diferenciação neuronal, a Hcy interferiu na diferenciação dos neurônios, interferindo também na migração neuronal. Adicionalmente, verificou-se que o tratamento com Hcy interferiu na diferenciação dos astrócitos, aumentando sua expressão, conduzindo a uma resposta conhecida como gliose reativa. Os resultados demonstram que, embora a Hcy não tenha comprometido o crescimento das vesículas encefálicas e das camadas celulares do telencéfalo, induziu alterações nos processos de proliferação celular e de diferenciação neuronal e glial em *G. domesticus*.

Palavras-chave: folatos, sistema nervoso central, embrião, desenvolvimento

ABSTRACT

Micronutrients are vitamins and minerals obtained from the diet required for growth, maintenance and reproduction of individuals. Folic acid (FA) is an B vitamin that participates in important metabolic reactions, such as the biosynthesis of essential compounds. FA nutritional deficiency produces an increase in homocysteine (Hcy) levels, and can cause neural tube defects (DTN). In this study we evaluated the effect of FA and Hcy in processes of cell proliferation and differentiation in the telencephalon of embryos of *Gallus domesticus*. Fertilized eggs of *G. domesticus* were incubated at 38 ° C and 65% humidity, and treatments were performed after 24 and 46 hours of incubation. The experimental groups were organized as follows: control - 50 µl saline (24 hours incubation) + 50 µl saline (46 hours incubation); AF- 50 µl saline (24 hours incubation) + 0.5 µg AF (46 hours incubation); Hcy- 50 µl saline (24 hours incubation) + 20 µmol Hcy (46 hours incubation); AF+Hcy - 0.5 µg AF (24 hours incubation) + 20 µmol Hcy (46 hours incubation). After, the egg's was sealed with non-toxic tape and returned to the incubator until the sixth embryonic day (E6). Thus the embryos were removed from eggs and prepared for further analysis. Morphometry of head and layers of telencephalon were performed. Immunohistochemistry were used to evaluate the cell proliferation, differentiation, neuronal and glial cell using the antibodies: anti-phosphohistone H3 (cell proliferation), anti-β tubulin III (neuronal differentiation) and anti-GFAP (glial differentiation). The morphology of cephalic region showed little variation among the treatments. Similarly, no changes were observed in the thickness of the layers of the telencephalon. Embryos treated with Hcy showed a significant reduction in cell proliferation in ependymal layer. Hcy caused disruptions in neuronal differentiation and migration. Additionally, it was found that treatment with Hcy interfer with the differentiation of astrocytes, increasing GFAP expression, leading to an astrocytic response known as reactive gliosis. These results demonstrate that, although Hcy has not compromised growth and brain vesicles layers of the telencephalon, induced significant changes in the processes of cell proliferation and in the differentiation of the neurons and glia in *G. domesticus* embryos.

Keywords: folate, central nervous system, embryos, development

LISTA DE FIGURAS E TABELA

Figura 1:	Esquema representativo do ciclo da remetilação e transulfuração da homocisteína.....	3
Figura 2:	Micrografia eletrônica da formação do tubo neural.....	4
Figura 3:	Representação esquemática da formação das vesículas primárias e secundárias.....	6
Figura 4:	Representação da histogênese do córtex cerebral.	7
Figura 5:	Ilustração esquemática do ovo de <i>Gallus domesticus</i>	13
Figura 6:	Ilustração das medidas morfométricas da região cefálica.....	17
Figura 7:	Ilustração representando o corte transversal do telencéfalo e lâmina com cortes seriados.....	18
Figura 8:	Cortes transversais de telencéfalo detalhando as mensurações realizadas nas camadas celulares.....	20
Figura 9:	Ilustração da gráticula de Weibel.....	21
Figura10:	Representação gráfica da morfometria da região cefálica.....	23
Figura11:	Cortes transversais do telencéfalo de embriões submetidos à coloração HE.....	24
Figura12:	Representação gráfica da morfometria das camadas celulares do telencéfalo de embriões.....	25
Figura13:	Cortes transversais do telencéfalo de embriões submetidos à técnica de imunohistoquímica para fosfo- histona H3.....	26
Figura14:	Representação gráfica da densidade numérica de células positivas para fosfo-histona H3.....	27
Figura15:	Cortes transversais do telencéfalo de embriões submetidos à técnica de imunohistoquímica para β -tubulina III.....	28
Figura16:	Representação gráfica da densidade numérica de células positivas para β -tubulina III.....	29
Figura17:	Cortes transversais do telencéfalo de embriões submetidos à técnica de imunohistoquímica para GFAP.....	30

Figura18:	Representação gráfica da densidade numérica de células positivas para GFAP.....	31
Tabela 1:	Pré – tratamentos e tratamentos realizados nos embriões de <i>G. domesticus</i>	15

LISTA DE ABREVIATURAS

AF	Ácido Fólico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CE	Camada Ependimária
CM	Camada do Manto
Cmg	Camada Marginal
CBS	Cistationa β -sintetase
DTN	Defeito do Tubo Neural (s)
EGF	Fator de crescimento epidermal, do inglês <i>epidermal growth factor</i>
FGF	Fator de crescimento fibroblasto, do inglês <i>fibroblast growth factor</i>
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida
Hcy	Homocisteína
HE	Hematoxilina - eosina
HH	Hamburger e Hamilton
IDR	Ingestão dose recomendada
MS	Metionina Sintetase
MTHF:	5-metiltetrahidrofolato
SNC	Sistema Nervoso Central
VL	Ventrículo Lateral

Sumário

1. Introdução.....	1
1.1 Ácido Fólico e o Metabolismo da Homocisteína.....	1
1.2 Formação e Desenvolvimento do Sistema Nervoso Central.....	4
1.3 Componentes Celulares do Sistema Nervoso Central.....	7
1.4 Migração Neuronal.....	9
1.5 Modelo Experimental.....	10
2. Objetivos.....	12
Objetivo Geral.....	12
Objetivos Específicos.....	12
3. Materiais e Métodos.....	13
3.1 Ovos da espécie de <i>Gallus domesticus</i>	13
3.2 Incubação dos Ovos de <i>Gallus domesticus</i>	14
3.3 Tratamentos dos Embriões.....	14
3.4 Análises Morfológicas.....	15
3.4.1 Morfologia Externa dos Embriões.....	15
3.4.2 Morfometria da Região Cefálica.....	16
3.5 Morfologia Microscópica dos Telencéfalos.....	17
3.5.1 Confeção dos Cortes e Análise Microscópica.....	17
3.5.2 Morfometria das Camadas do Telencéfalo.....	19
3.6 Estereologia dos Cortes Histológicos.....	20
3.7 Análise Estatística.....	21
4. RESULTADOS.....	22
4.1 Morfometria da Região Cefálica.....	22
4.2 Microscopia do Telencéfalo.....	24
4.3 Morfometria das Camadas do Telencéfalo.....	24
4.3.1 Proliferação Celular.....	25
4.3.2 Diferenciação Neuronal.....	27
4.3.3 Diferenciação Glial.....	29
5. Discussão.....	32
6. Considerações Finais.....	37
7. Referências.....	38

1. Introdução

Os micronutrientes, vitaminas e minerais obtidos da dieta, são elementos necessários para o crescimento, manutenção e reprodução dos indivíduos (HAIDER e BHUTTA, 2006). Durante o desenvolvimento embrionário, a nutrição materna é de extrema importância para o embrião, visto que seus órgãos em formação são muito suscetíveis, e qualquer variação ou a carência de determinado componente pode interferir no seu desenvolvimento natural (CARLSON, 1994). As vitaminas são compostos orgânicos essenciais para o desenvolvimento, e embora sejam requeridas em pequenas quantidades, participam como coenzimas em importantes reações metabólicas, como a biossíntese de compostos essenciais (BRODY, 1999). Devido a esta importante função, a carência de vitaminas durante o desenvolvimento pode provocar danos ao embrião, a exemplo do que ocorre quando há deficiência das vitaminas do complexo B, como ácido fólico (AF) e folatos (BLACK, 2001).

1.1 Ácido Fólico e o Metabolismo da Homocisteína

Embora os termos ácido fólico e folato sejam empregados como sinônimos, há diferença no significado de ambos os termos. Folatos são vitaminas do complexo B encontradas naturalmente na natureza, enquanto que o AF é a forma sintética da vitamina (quimicamente mais estável), largamente utilizada na fortificação de alimentos e suplementos nutricionais (CUSKELLY et al., 1996; DJUKIC, 2007).

Na natureza, este grupo de vitaminas é encontrado em vegetais verdes folhosos, frutas cítricas, laticínios, batatas, fígado, leveduras (LUCOCK, 2000), e ao serem ingeridos permanecem na forma inativa, necessitando de ‘ativação’ por meio de reações bioquímicas. Desta forma, através de reações enzimáticas, estes compostos são convertidos na sua forma ativa e mais comumente encontrada nos tecidos, o 5-metiltetraidrofolato (MTHF) (MILLER, 2008). Através da doação de carbonos, os folatos atuam em processos celulares essenciais, como a conversão de serina em glicina, o catabolismo de histidina, a síntese metionina e purinas (LUCOCK, 2000) bem como a remetilação da homocisteína (Hcy, do inglês *homocysteine*) (MATTSON e SHEA, 2003). Em geral, células em proliferação e com rápido crescimento, necessitam de um aporte adequado de folatos, já que há uma demanda

deste elemento na biossíntese de nucleotídeos necessários para a replicação do DNA (KRISHNASWAMY e NAIR, 2001).

Na década de 70, o pediatra Smithells elaborou um dos primeiros estudos que relacionou o metabolismo do folato com a ocorrência de defeitos do tubo neural (DTN's) (SMITHELLS et al., 1976). Tais defeitos são resultantes de falhas no fechamento do tubo neural, que podem afetar a formação do encéfalo, da medula espinhal ou de ambos (O'RAHILY e MÜLLER, 1994). Detalhes sobre a formação do tubo neural serão apresentados mais adiante na introdução.

Os estudos de Smithells et al (1976) demonstraram que mulheres que haviam dado a luz a uma ou mais crianças com DTN apresentavam níveis baixos de AF. Dentre estas mulheres, as que desejavam engravidar novamente, foram recrutadas e receberam suplementação com vitaminas no período pré-concepcional até o segundo mês de gravidez. Como resultado, a recorrência dos DTN's foi de 0-5% em mulheres suplementadas e 4% em mulheres que não foram suplementadas (SMITHELLS et al., 1981). No Brasil, visando a prevenção dos erros do desenvolvimento, como DTN, causados pela carência de AF, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), tornou obrigatória a fortificação das farinhas de trigo e milho com AF através da resolução (RDC-Anvisa nº 344/2002), onde cada 100 g do produto deve fornecer 150 mcg de AF, o que representa 37% da ingestão diária recomendada (IDR) no adulto (400 mcg) (BRASIL, 2005).

A ingestão materna de AF antes e durante as primeiras semanas de gestação reduz a ocorrência dos DTN, sendo que estes defeitos estão associados também a elevados índices plasmáticos de Hcy (DE LA CALLE et al., 2003; MATTSON e SHEA, 2003; BRAUER e TIERNEY, 2004).

Identificada em 1932 por Vicent du Vigneaud, a Hcy é um aminoácido não essencial que contém enxofre em sua constituição. É formada exclusivamente pela metionina derivada da dieta através da reação de transmetilação, e ao ser sintetizada pode sofrer transulfuração ou remetilação (FINKELSTEIN, 2000; VAN DER PUT et al., 2001; BOTTIGLIERI, 2005).

Na via de transulfuração a Hcy é convertida em cisteína, pela ação da enzima cistationa β -sintetase (CBS), que requer a presença de vitamina B6 como co-fator (FINKELSTEIN, 2000; DE LA CALLE, USANDIZAGA et al., 2003). Através da reação de remetilação, a

enzima metionina sintetase (MS) converte a Hcy em metionina novamente, sendo que esta reação é dependente da presença de AF, vitamina B12 e vitamina B6 (Figura 1) (BOTTIGLIERI, 2005; OBEID e HERRMANN, 2006). Além da carência de AF, falhas enzimáticas na metilação ou transulfuração da homocisteína, induzem seu acúmulo no organismo, o que representa um potencial dano às células.

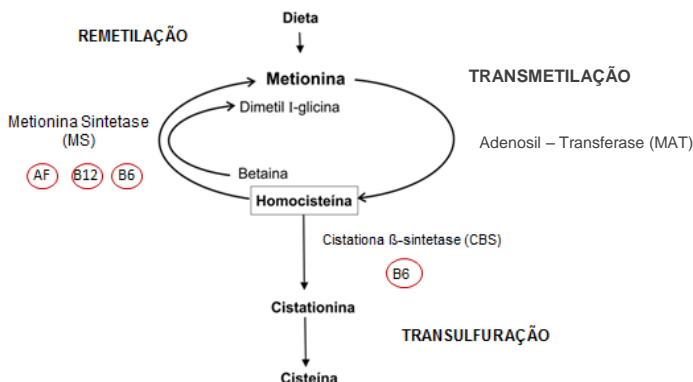


Figura 1: Via metabólica da homocisteína (modificado de ASHFIELD-WATT, MOAT et al., 2001)

Elevados níveis de Hcy induzem diferentes alterações, como o estresse oxidativo e danos ao DNA, que desencadeiam a apoptose no sistema nervoso (ZHU et al., 2003; AFMAN et al., 2005; SACHDEV, 2005), além do que, em cultura de neurônios corticais de ratos, a Hcy induz degeneração neuronal através do aumento do influxo de cálcio e espécies reativas de oxigênio (HO et al., 2002).

Além das alterações provocadas no sistema nervoso central, diversos estudos sobre os efeitos embriotóxicos da Hcy demonstram que este aminoácido, quando em altas concentrações, pode ocasionar anormalidades cardíacas, defeitos orofaciais, malformações em membros, prejudicar a vascularização extra-embriônica, como apresentado na revisão proposta por Van Mil *et al.* (2010).

Considerando que os elevados níveis de Hcy durante o desenvolvimento embrionário estão relacionados a danos celulares e à ocorrência de DTN, faz-se necessário compreender o processo de

formação do tubo neural e do sistema nervoso central (SNC), para poder interpretar adequadamente os efeitos celulares da Hcy e sua relação com DTN.

1.2. Formação e Desenvolvimento do Sistema Nervoso Central

Nos embriões de vertebrados, o desenvolvimento SNC inicia com o processo de neurulação, através do qual forma-se o tubo neural, estrutura que posteriormente originará o encéfalo e a medula espinhal (WOLPERT et al., 2002).

A formação do tubo neural ocorre através de duas etapas distintas: (1) neurulação primária, onde há a diferenciação do ectoderma em ectoderma neural; neste ponto, as células do ectoderma adquirem mudanças no seu formato (tornam-se alongadas), possibilitando a formação da placa neural. Em seguida, uma sequência de eventos como: a elevação das pregas neurais, formação do sulco e da goteira neural contribuem para a o fechamento do tubo. Este tipo de neurulação é responsável pela organização da região anterior do tubo neural (GILBERT, 2010) (Figura 2); (2) já na neurulação secundária, a região caudal do tubo neural é formada a partir de um cordão de células mesenquimais, que posteriormente produz pequenas cavidades, resultando na formação do canal central do tubo neural (O'RAHILY e MÜLLER, 1994; GILBERT, 2010). Logo, a neurulação primária é responsável pela formação do encéfalo e grande parte da medula espinhal, e a neurulação secundária pelos segmentos inferiores da medula (COLAS e SCHOENWOLF, 2001).

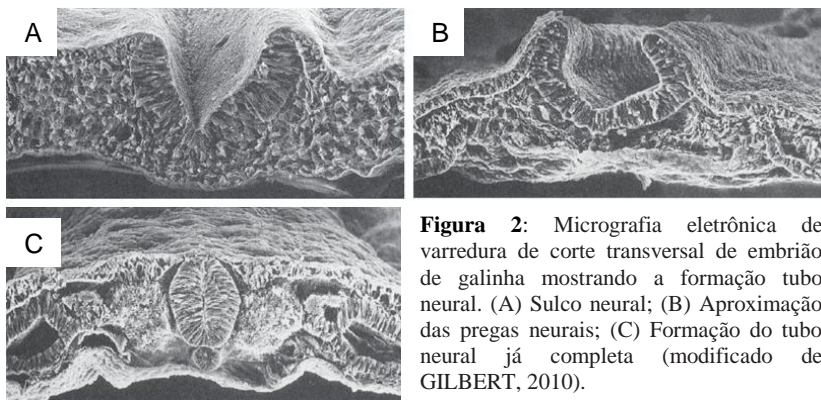


Figura 2: Micrografia eletrônica de varredura de corte transversal de embrião de galinha mostrando a formação tubo neural. (A) Sulco neural; (B) Aproximação das pregas neurais; (C) Formação do tubo neural já completa (modificado de GILBERT, 2010).

Ao longo do processo de neurulação, as células do ectoderma neural expressam caderinas - proteínas transmembrana com função de adesão celular. Estas proteínas atuam facilitando a movimentação, curvatura e adesão das pregas neurais (SHAPIRO e COLMAN, 1998; REDIES, 2000). Na placa neural um tipo específico de caderina, a N-caderina, juntamente com filamentos de actina auxiliam nesta flexibilidade do neuroepitélio (REDIES, 2000; ALBERTS, 2006).

Logo após o fechamento do tubo neural, sua parede é constituída por uma única camada de células neuroepiteliais que proliferam continuamente, formando um epitélio pseudo-estratificado, onde os núcleos das células se dispõem em diferentes alturas, dando a impressão deste tubo ser formado por diversas camadas celulares. Estas células neuroepiteliais são precursoras dos neuroblastos e dos glioblastos, que originarão os neurônios e as células da glia (glia radial, astrócitos e oligodendrócitos) (LENT, 2005).

Células neuroepiteliais atuam como células-tronco do SNC devido a duas importantes características, autorrenovação, que é a capacidade da célula se dividir e gerar mais células-tronco com nova capacidade de divisão (no caso do SNC por um número limitado de vezes) e multipotência, pois possuem a competência de gerar células precursoras bipotentes, que podem dar origem a células tanto da linhagem neural quanto glial. Esta multipotência, é resultado de alterações na expressão gênica destas células (HYTTEL et al., 2012) e liberação de compostos sinalizadores como fatores neurotróficos, entre eles, o fator de crescimento epidérmico (EGF), e o fator de crescimento do fibroblasto (FGF) (KOLB e WHISHAW, 2002).

O desenvolvimento, alongamento, e a regionalização do tubo neural na extremidade anterior, promove a formação das vesículas encefálicas primitivas, denominadas prosencéfalo (cérebro anterior), mesencéfalo (cérebro médio) e rombencéfalo (cérebro posterior), onde cada uma dará origem a diferentes partes do encéfalo (SCHOENWOLF, 1999). A partir destas três vesículas primárias formam-se as cinco vesículas secundárias (Figura 3). Assim, o prosencéfalo origina o telencéfalo e o diencéfalo, onde o primeiro constitui os hemisférios cerebrais e a sua cavidade os ventrículos laterais, já o segundo dá origem ao tálamo, hipotálamo e vesículas ópticas (BELLAIRS e OSMOND, 2005). O mesencéfalo não apresenta divisões e sua cavidade se tornará o aqueduto cerebral. Já o rombencéfalo, origina o metencéfalo

e o mielencéfalo, onde o primeiro formará o cerebelo e a ponte, e o segundo formará o bulbo (LENT, 2005).

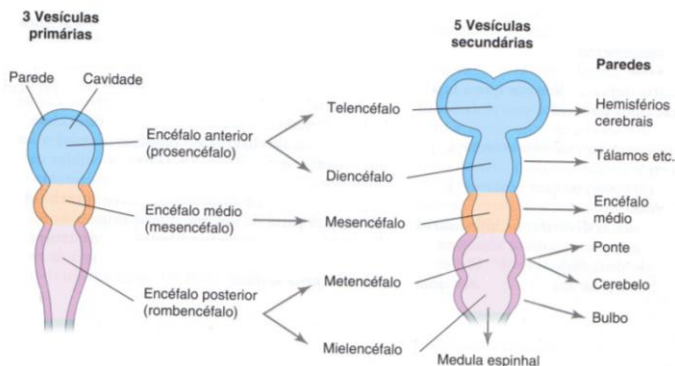


Figura 3: Vesículas encefálicas em humanos. As três vesículas primárias se subdividem para dar origem as cinco vesículas secundárias (modificado de MOORE e PERSAUD, 2008).

No telencéfalo, região do encéfalo abordada neste trabalho, a camada endimária é a região que dá origem aos neuroblastos, que ao cessarem suas mitoses migram perifericamente para formar a camada do manto (SCHOENWOLF et al., 2009). Esta migração é amparada por células já presentes no tubo neural precoce – a glia radial, que por meio de seus prolongamentos fornecem substrato para a migração. Num segundo momento, os neuroblastos migram, perdem a capacidade de divisão celular, se diferenciam a fim de organizar as camadas celulares que constituirão a pré-placa, placa e camada marginal (Figura 4). Por fim, a camada da placa cortical se subdivide em camadas definitivas de neurônios do córtex cerebral maduro (LENT, 2005). Logo que a produção de neurônios se torna completa, a camada endimária passa a produzir as células da glia (astrócitos e oligodendrócitos) (KIERSZENBAUM, 2008; SCHOENWOLF, BLEYL et al., 2009).

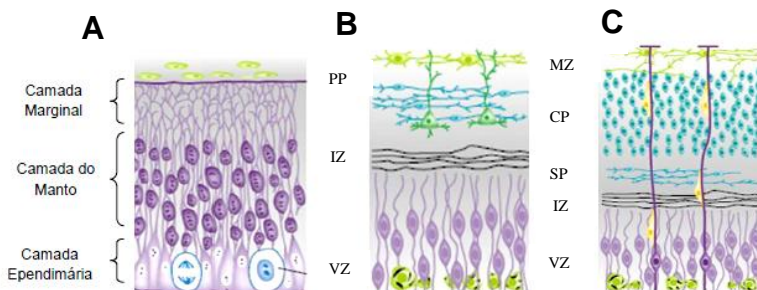


Figura 4: Histogênese do córtex encefálico. Em (A), parede encefálica em um momento mais precoce do desenvolvimento. Nota-se a presença de células precursoras na camada endimária. (B) Início da diferenciação das camadas e (C) Córtex cerebral formado. (VZ) zona ventricular; (IZ) zona intermediária; (PP) pré-placa; (SP) sub-placa; (CP) placa cortical; (MZ) zona marginal (modificado de CAMPBELL e GÖTZ, 2002).

1.3. Componentes Celulares do Sistema Nervoso Central

O conhecimento sobre os componentes celulares do SNC foi se consolidando a partir dos estudos e técnicas de dois cientistas do século XIX. Inicialmente, Camillo Golgi, utilizando solução de nitrato de prata corou tecido nervoso revelando ao microscópio estruturas neuronais, como os dendritos e os axônios. Posteriormente, Santiago Ramon y Cajal, utilizou o método desenvolvido por Golgi em estudos histológicos do cerebelo, fornecendo importantes dados sobre a estrutura e conexões dos neurônios (SALLET, 2009). Além disso, Ramon y Cajal contribuiu também para os estudos das células da glia, desenvolvendo um tipo de coloração específica para estas células, que permitiu realizar a sua descrição morfológica e indicar possíveis funções, sendo esta utilizada até os dias de hoje (GARCÍA-MARÍN et al., 2007).

O normal funcionamento do cérebro requer a integração anatômica, bioquímica e fisiológica dos vários tipos celulares que compõem o tecido nervoso. A célula que é considerada a unidade básica deste tecido é o neurônio - célula altamente especializada responsável por receber, processar e enviar informações. Com morfologia complexa, um neurônio típico é constituído por domínios bem definidos: (1) dendritos, numerosos prolongamentos ramificados que recebem e enviam estímulos para o corpo celular (2) corpo celular, contém o núcleo e as principais organelas citoplasmáticas, (3) axônio, um único

prolongamento que conduz o impulso nervoso e (4) telodendros, porção final do axônio composto por pequenas ramificações (HOF et al., 2009).

A capacidade dos neurônios de realizar movimentos coordenados, interagir com o ambiente que o circunda, migrar durante o desenvolvimento e organizar seu conteúdo interior, é dependente do seu citoesqueleto – uma complexa rede de proteínas interligadas composta por três tipos de filamentos proteicos: filamentos de actina, filamentos intermediários e microtúbulos (ALBERTS, 2006), sendo este último filamento, formado por subunidades de moléculas de α -tubulina e β -tubulina (GOZES, 1982). Aproximadamente 10% das proteínas totais do cérebro, são tubulinas (BRADY et al., 2009), sendo que um subtipo especial, a β -tubulina III é considerada um marcador para células neuronais em estudos de desenvolvimento (KATSETOS et al., 2003).

Por muito tempo, achou-se que o neurônio era a única célula funcional presente do cérebro, e que as células da glia, por exemplo, seriam células apenas de sustentação, atuando apenas como tecido de conexão. As células gliais, também conhecidas como neuroglia, foram descritas em 1858 pelo patologista Rudolf Virchow, que naquela ocasião, nomeou-as de *Nervenkitt* (cimento de nervo) por considerar que estas atuavam apenas no suporte dos neurônios. Estas células compreendem a glia radial, astrócitos e oligodendrócitos (GOMES et al., 2013).

A glia radial possui longos prolongamentos citoplasmáticos que se estendem da camada ependimária até as zonas mais corticais atuando como guia durante a migração de neurônios jovens. Porém, esta função de guia é transitória, já que ao final da migração estas células podem se transformar em astrócitos (MONTGOMERY, 1994), neurônios (ALVAREZ-BUYLLA et al., 2001), ou ainda podem persistir no cérebro adulto como um tipo especial de glia, a glia de Bergmann presente no cerebelo e a glia de Muller, encontrada na retina (KRIEGSTEIN e GOTZ, 2003).

No SNC, a mielinização das fibras nervosas é executada pelos oligodendrócitos no período pós-natal, através da produção da bainha de mielina (LENT, 2005; HOF, NIMCHINSKY et al., 2009). Ainda que os axônios realizem suas funções antes do revestimento de mielina, o seu funcionamento normal somente é atingido após a mielinização completa no período pós-natal e início da vida adulta (KOLB e WHISHAW, 2002).

Com formato variado e quantidade superior aos neurônios e as demais células da glia, os astrócitos - assim chamados por sua morfologia estrelada, desempenham inúmeras funções dentro do SNC (GARCÍA-MARÍN, GARCÍA-LÓPEZ et al., 2007). Os astrócitos nas últimas décadas vêm ganhando mais destaque, e seu papel é tão essencial para o funcionamento do SNC quanto o do neurônio. Em recentes estudos, são atribuídas a esta célula diversas funções como a regulação do fluxo sanguíneo cerebral, isolamento elétrico dos neurônios, regulação do metabolismo dos neurotransmissores, controle da sinaptogênese (BARRES, 2008), auxílio na formação da barreira hematoencefálica, que atua como barreira de proteção entre os vasos sanguíneos e o cérebro (KOLB e WHISHAW, 2002). Atuam também em resposta a lesões no SNC, sendo que esta resposta gera uma condição denominada gliose reativa, onde há um aumento da expressão da proteína glial fibrilar ácida (GFAP, do inglês *glial fibrillar acid protein*) (GOMES et al., 1999).

A GFAP é o principal tipo de filamento intermediário presente no citoplasma de astrócitos maduros, sejam eles normais, reativos ou neoplásicos. Descoberta primeiramente no ano de 1970 em tecido cerebral com esclerose múltipla, esta proteína está envolvida na modulação da motilidade e forma dos astrócitos, o que leva a estabilidade dos filamentos astrocísticos de 8-9 nm (ENG et al., 2000). A proteína vimentina é outro tipo de filamento intermediário expresso em astrócitos, porém imaturos. Com o desenvolvimento e diferenciação destas células, a vimentina vai sendo progressivamente substituída por GFAP (MACHADO e FIGUEIREDO, 1996).

1.4. Migração Neuronal

A interação celular é um fator preponderante durante a migração neuronal. A migração radial, que utiliza a glia radial como guia, é o tipo de migração mais utilizada por neurônios migrantes (HATTEN, 1999; CAMPBELL e GÖTZ, 2002). Além deste tipo de migração, os neurônios podem utilizar outra via que é independente das células da glia - a migração tangencial. Neste tipo de migração, os neurônios movimentam-se paralelamente ao ventrículo, formando um agregado de neurônios migratórios, onde todos se encontram aderidos uns aos outros (SOBEIH e CORFAS, 2002).

Dois fatores parecem influenciar a migração dos neurônios, o local e o momento em que estes foram gerados. Determinados sítios na camada ventricular fornecem um mapa de equivalência para específicas áreas no futuro córtex (RAKIC e SWAAB, 1988), já o momento em que estes neurônios foram gerados (mais precocemente ou tardiamente) determina o seu tipo de distribuição, onde os neurônios mais jovens dispõem-se na zona ventricular (HATTEN, 1999), e os gerados tardiamente são encontrados nas camadas mais superficiais do córtex (HYTTTEL, SINOWATZ et al., 2012).

Sinais presentes na matriz extracelular também atuam a fim de conduzir o neurônio no processo migratório, estes sinais incluem proteínas, como as integrinas, lamininas e relinas, que regulam o movimento, velocidade e a orientação dos neurônios (SOBEIH e CORFAS, 2002).

1.5. Modelo Experimental

Embriões de *G. domesticus* são amplamente utilizados em estudos de biologia do desenvolvimento de vertebrados. Seu rápido desenvolvimento (21 dias) foi documentado primeiramente no século IV a.C. por Aristóteles na Grécia antiga (WOLPERT, 2004).

O aprimoramento de técnicas histológicas foram essenciais para os estudos de Embriologia, e isto só se tornou possível na segunda metade do século XIX. Nesta época, Wolff descreveu claramente o desenvolvimento de um embrião de galinha. As ideias desenvolvidas a partir daí, condicionaram o progresso científico e influenciaram positivamente os estudos em embriologia (HOUILLON, 1972). Desde então, a espécie de *G. domesticus* destaca-se como um ótimo modelo biológico por apresentar características que facilitam sua utilização em diversos estudos. Os ovos da espécie são de fácil obtenção tanto em quantidade como em custo, seu armazenamento em incubadoras artificiais não requer instalações complexas e podem ser acompanhados diariamente por estarem fora do útero da mãe (SCHOENWOLF, 1999). Além do que, o estagiamento (HH) de *G. domesticus* é de fácil realização, e tem como base os critérios morfológicos estabelecidos por Hamburger e Hamilton (1951).

A estrutura e composição dos ovos de *G. domesticus* é também um fator importante que possibilita o seu desenvolvimento longe da influencia da mãe e permite sua incubação artificial. Após a postura, o

ovo já contém todos os nutrientes necessários para o desenvolvimento do embrião, inclusive o aporte oxigênio, que chega até o embrião através dos poros da casca do ovo (BELLAIRES e OSMOND, 2005). Além dos aspectos citados, a biologia da espécie está bem descrita, com importantes dados sobre sua embriologia e desenvolvimento, sobretudo em estudos de toxicologia e teratologia (SCHOENWOLF, 1999).

Quanto à formação do SNC desta espécie, a neurulação inicia após 20 horas de incubação e termina com cerca de 55 horas de incubação. Antes de concluir o fechamento do tubo neural, as vesículas primárias já podem ser reconhecidas a partir de 33 h de incubação, completando suas subdivisões para formar as cinco vesículas encefálicas secundárias com cerca de 48 h de incubação (HAMBURGER e HAMILTON, 1951).

Diante da relevância do tema aqui abordado, e da pouca disponibilidade de estudos que esclareçam como os elevados níveis de Hcy interferem nos tecidos e na resposta celular do SNC em desenvolvimento, o presente trabalho propõe o estudo dos efeitos da Hcy sobre os mecanismos celulares e teciduais inerentes ao desenvolvimento do sistema nervoso, utilizando embriões de galinha doméstica, *G. domesticus*, como modelo experimental.

2. Objetivos

- Geral

Caracterizar o efeito do AF e da Hcy sobre os processos de proliferação e diferenciação celular no telencéfalo de embriões de *G. domesticus*.

- Específicos

- Avaliar se os tratamentos com AF e Hcy alteram a morfologia externa da região cefálica dos embriões de *G. domesticus*;

- Caracterizar o efeito do tratamento com AF e Hcy sobre o mecanismo de proliferação celular nas camadas que compõem o telencéfalo dos embriões;

- Avaliar se o tratamento com AF e Hcy interfere no processo de diferenciação das células neuronais e gliais nas camadas do telencéfalo dos embriões;

3. Materiais e Métodos

3.1. Ovos da espécie de *G. domesticus*:

No desenvolvimento deste trabalho foram utilizados embriões de galinha doméstica da espécie *G. domesticus*, obtidos a partir de ovos fertilizados, cedidos pela Empresa Tyson do Brasil - São José/SC. Os ovos foram transportados em bandejas com acomodações individuais ao Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal - Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética (BEG) do Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina. Ao chegar ao laboratório, os ovos foram limpos, numerados e tiveram a massa aferida em balança de precisão (g).

Logo após a postura, os ovos da espécie devem ser incubados para que prossiga o seu correto desenvolvimento, que já teve início anteriormente no oviduto da galinha através de sucessivas divisões celulares. Neste momento, o embrião está no estágio de blástula, e o ovo embrionizado consta das seguintes partes: casca, membranas da casca, câmara de ar, albúmen (clara) e vitelo (gema), sendo que na região do vitelo, encontra-se a blastoderme – local do desenvolvimento do futuro embrião (Figura 5) (GARCIA et al., 1991).

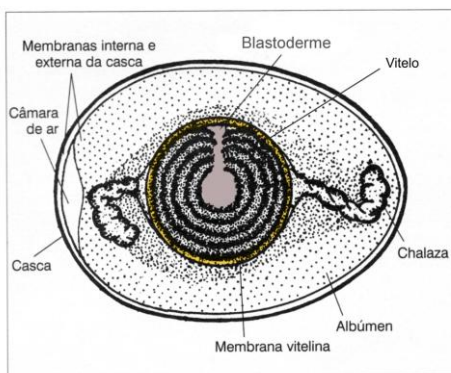


Figura 5: Ilustração esquemática do ovo de *Gallus domesticus* (modificado de GARCIA, JECKEL NETO et al., 1991).

3.2. Incubação dos Ovos de *Gallus domesticus*

Em laboratório, os ovos permaneceram em repouso por um período médio de 96 horas a uma temperatura variável de 10 e 15°C. Em seguida, foi realizada a incubação dos ovos na posição vertical em estufa Petersime a temperatura de 37,5 °C ($\pm 0,5$ °C) e 65% de umidade.

Para as análises do desenvolvimento, os estágios embrionários foram determinados a cada 24 horas, o que determina cada dia embrionário (E), a partir do início da incubação. Para a realização deste estagiamento foram considerados os critérios morfológicos descritos por Hamburger e Hamilton (1951) para a espécie *G. domesticus*.

Os procedimentos realizados nesta pesquisa foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC, sob o número 23080.025620/2009-51.

3.3. Tratamentos dos Embriões

Os tratamentos dos embriões foram realizados *in ovo*, através de uma pequena abertura (1,5 cm de diâmetro) da membrana externa da casca para permitir a exposição do embrião. A administração das substâncias AF e Hcy, foi realizada com micropipeta na região da câmara de ar.

Os tratamentos foram realizados em duas etapas, sendo o pré-tratamento em E1 (24 horas de incubação) e o tratamento em E2 (46 horas de incubação), conforme os grupos experimentais descritos abaixo:

Tabela 1: Pré – tratamentos e tratamentos realizados nos embriões de *G. domesticus*

Grupo	Pré-tratamento (E1)	Tratamento (E2)	Objetivo
1	50 µl de solução salina	0.5 µg AF	Reconhecer o efeito isolado do AF
2	50 µl de solução salina	20 µmol Hcy	Reconhecer o efeito isolado da Hcy
3	0.5 µg AF	20 µmol Hcy	Reconhecer o efeito protetor do AF em relação à Hcy
4	50 µl de solução salina	50 µl de solução salina	Grupo controle do experimento

Em cada experimento foram utilizados previamente 5 embriões por grupo, sendo os experimentos realizados em triplicatas

Concluída a realização dos tratamentos, a abertura da casca dos ovos foi fechada com fita adesiva transparente não tóxica, os ovos recolocados na estufa, e monitorados diariamente para o controle da sobrevivência, até que se completassem 4 dias.

3.4. Análises Morfológicas

3.4.1. Morfologia Externa dos Embriões

Os embriões em E6 tiveram seu desenvolvimento cessado ao serem retirados da incubadora e colocados em refrigerador a 4°C por 15 minutos. Passado este período, com o auxílio de uma tesoura cirúrgica e colher, os embriões foram removidos das membranas extraembrionárias e colocados em placa de Petri contendo solução salina a 0,9%. Após, foram fixados em formaldeído a 10% por 24 horas e conservados em etanol 70%, onde permaneceram até que fossem analisados ao estereomicroscópio de luz (20 X) a fim de determinar se os embriões estavam no estágio previsto de E6, se continham alguma anomalia e

também para a realização posterior da morfometria das vesículas encefálicas.

3.4.2. Morfometria da Região Cefálica

A análise morfométrica dos encéfalos foi realizada para verificar as dimensões das vesículas encefálicas submetidas aos diferentes tratamentos. Para isto, utilizou-se uma grátícula milimetrada acoplada ao estereomicroscópio (20 x).

Foram estabelecidas cinco tipos de medidas (Figura 6), de acordo com o trabalho de Kobus (2007).

Medida 1: *distância cefálica ântero-posterior*: medida desde a extremidade anterior do telencéfalo à extremidade posterior do mielencéfalo passando pela vesícula óptica.

Medida 2: *altura cefálica*: distância medida do topo do mesencéfalo até a altura do I – II arco faríngeo, passando pela vesícula óptica;

Medida 3: *distância ântero-posterior do telencéfalo*: medida horizontal ântero-posterior na base do telencéfalo;

Medida 4: *altura do telencéfalo*: medida perpendicular à distância ântero-posterior na base do telencéfalo;

Medida 5: *distância ântero-posterior do mesencéfalo*: medida horizontal ântero-posterior realizada na base do mesencéfalo;

Medida 6: *altura do mesencéfalo*: medida perpendicular à distância ântero-posterior na base do mesencéfalo;

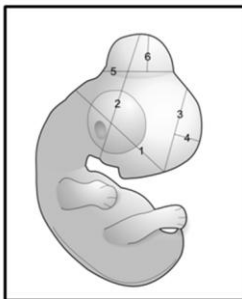


Figura 6: Ilustração das medidas das vesículas encefálicas dos embriões (E6) realizadas com o auxílio da grátula milimetrada acoplada ao estereomicroscópio de luz (20x).

3.5. Morfologia microscópica dos telencéfalos

Para a análise da micromorfologia dos telencéfalos previamente fixados e analisados, foi realizada a dissecação dos mesmos com auxílio de pinça de ponta fina. Após a dissecação, os encéfalos foram desidratados em série etanólica crescente (70 até 90%) por 30 minutos em cada álcool, após, as peças são embebidas álcool absoluto (100%) por 50 minutos, sendo este último passo repetido novamente. Em seguida, as peças foram diafanizadas por 5 minutos em álcool/xilol (1:1), em seguida foram feitos dois banhos em xilol por aproximadamente 5 minutos cada, ou até que a peça torne-se translúcida. Foram realizados então três banhos em parafina a temperatura de 57°C por 1 hora cada. No último banho, as peças foram orientadas para a realização de cortes transversais. Por fim, o material foi mantido em temperatura ambiente para solidificação da parafina.

3.5.1 Confeção dos Cortes e Análise Microscópica

Os cortes seriados transversais dos telencéfalos foram realizados em micróto mo rotativo a uma espessura de 6µm, e distribuídos em lâminas previamente gelatinizadas (Figura 7), onde cada lâmina continha os quatros tratamentos dispostos em fileiras. Ao final, estas estavam prontas para a realização das seguintes técnicas:

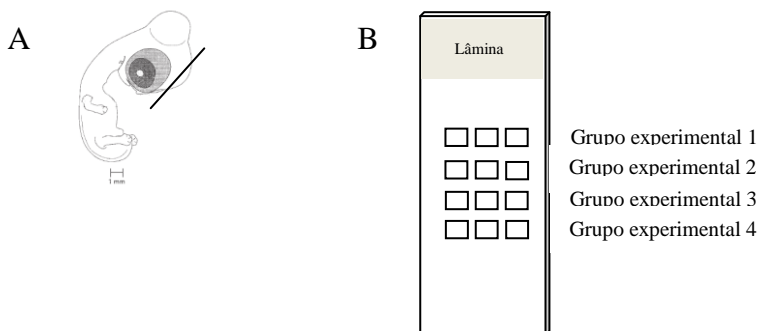


Figura 7: Ilustrações representando em (A) esquema do corte frontal realizado no telencéfalo dos embriões. (B) Exemplo de uma lâmina com os cortes seriados. (A- modificado de Bellairs e Osmond, 2005).

a) Coloração Hematoxilina-Eosina (HE)

As lâminas destinadas ao método dicrômico de coloração (HE) foram utilizadas para controle histológico, que visa evidenciar a qualidade do tecido. Estas lâminas foram desparafinizadas em dois banhos consecutivos de xilol por 10 minutos cada; re-hidratadas em sequência decrescente de álcool absoluto (100%) até álcool 70% por 10 minutos cada. A seguir, as lâminas foram lavadas em água corrente por 8 minutos, embebidas em Hematoxilina de Harris por 1 minuto e 15 segundos, lavadas novamente em água corrente por 10 minutos, imersas em eosina aquosa (1%) e por fim lavadas em água destilada por 5 minutos. Posteriormente, seguiu-se com a desidratação em sequência etanólica crescente, do álcool 70% até álcool absoluto 100% todos por 10 minutos, finalizando com dois banhos consecutivos de xilol por 5 minutos cada. As lâminas foram então montadas com Entelan[®].

b) Técnica de Imuno-Histoquímica

Lâminas histológicas contendo os quatro tratamentos foram destinadas a marcações celulares por imuno-histoquímica para as finalidades de: reconhecimento das células em proliferação celular (anticorpo anti- fosfohistona H3), diferenciação neuronal (anticorpo

anti- β tubulina III) e diferenciação glial (anticorpo anti-GFAP). As lâminas após desparafinização e hidratação foram submetidas a 1 banho de peróxido de hidrogênio 10% em metanol (1 : 2) por 10 minutos no escuro para o bloqueio das peroxidases endógenas; em seguida as lâminas foram lavadas 2 vezes por 5 minutos em tampão fosfato salino (PBS) pH de 7,4, seguida de 1 banho de 15 minutos em tampão PBS + Triton X- 100[®] a 0,3%. O bloqueio de sítios inespecíficos foi realizado com soro fetal bovino (BSA, do inglês *bovine fetal serum*) a 5% com tampão PBS-Triton X-100[®] a 0,1% por 40 minutos. A seguir foi realizada a incubação com anticorpo primário, a saber: anti-fosfohistona diluição (1:300), anti-beta tubulina III (1:100) e anti-GFAP (1:50) em tampão PBS por 12 horas a 4°C. Passado este tempo, as secções foram lavadas seis vezes em tampão PBS Triton X-100[®] a 0,1% e incubadas com anticorpo secundário.

As secções incubadas com anti-fosfohistona foram incubadas com anti-coelho na diluição 1:400, já as com anti-beta tubulina III, com anti-mouse e diluídas 1:200, e as anti-GFAP foram incubadas com anti-coelho conjugado a biotina, todas em tampão PBS + BSA por um período de 3 horas em temperatura ambiente. Após este período, prosseguiram com lavagem de 7 banhos em tampão PBS Triton X-100[®] a 0,1% por 5 minutos cada. As secções preparadas com anti-GFAP foram então lavadas com três banhos de tampão PBS por 10 minutos cada, para prosseguir com a incubação com extravidina em Triton X-100[®] a 0,3% + BSA por 45 minutos numa diluição de 1:20. Após, foi realizado sete banhos em tampão PBS Triton X-100[®] a 0,1% por 5 minutos cada. Por fim, as secções foram tratadas com solução de 3-3'-diaminobenzidina (DAB - Sigma Chemical) até que os cortes apresentassem a tonalidade marrom claro; ao atingir a tonalidade desejada, a reação foi interrompida com água destilada por 5 minutos. A seguir, as secções foram desidratadas em série etanólica crescente, diafanizadas em xilol e a lâminas finalizadas com meio de montagem Entelan[®].

3.5.2. Morfometria das camadas do telencéfalo

As espessuras das camadas endimária, do manto e marginal, foram mensuradas com auxílio de ocular micrométrica acoplada ao microscópio de luz (400X) (Figura 8). Após, foi realizado o cálculo da espessura das camadas, através da seguinte fórmula: espessura da

camada x 0,212. Para esta análise, foram utilizados 12 cortes histológicos por grupo, onde todos os grupos analisados apresentavam padrão morfológico normal, ou seja, não exibiam malformações aparentes.

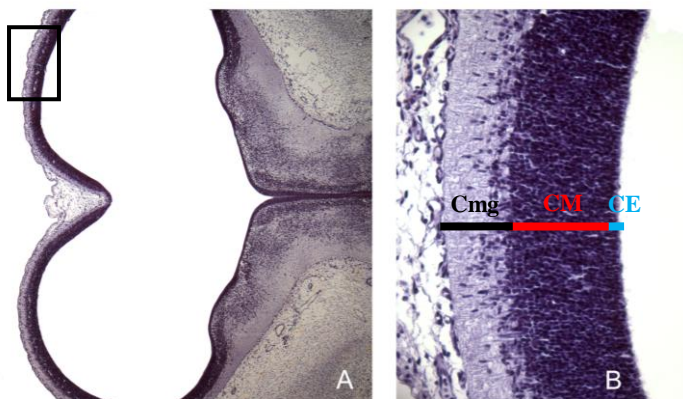


Figura 8: Cortes transversais de telencéfalo (6 μ m) de embriões de *G. domesticus*. Em (A) vista geral do telencéfalo e o detalha da região a ser analisada. (B) esquema delimitando as camadas do telencéfalo. CE- camada ependimária; CM- camada do manto e Cmg- camada marginal.

3.6. Estereologia dos Cortes Histológicos

A quantificação das células positivas na análise por imunohistoquímica foi realizada através do método estereológico, utilizando a Gráticula de Weibel nº 2 – M42 (Figura 9) acoplada ao microscópio óptico (1000 X). Nesta contagem de células imunorreativas, foram utilizados 6 campos alternados ao longo do telencéfalo, onde foram contabilizadas apenas as células que se encontravam localizadas no limite da barra ou em cima desta, como mostrado no detalhe da figura 9. O cálculo da densidade de células positivas por área, foi feito através da fórmula $NA = (\text{número de células positivas} / 36,36) * 0,0004$ (MANDARIM-DE-LACERDA, 2003).

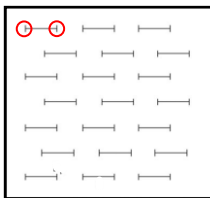


Figura 9 - Grátícula de Weibel (modificado Mandarin-de-Lacerda, 2003).

3.7. Análise estatística

Os resultados quantitativos obtidos nas análises de morfometria da região cefálica e densidade numérica das células positivas por imunohistoquímica foram analisados no programa estatístico Statistica®, versão 6.0. Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) foram avaliadas pelo teste de análise de variância (ANOVA one – way), seguido do teste *post-hoc* de Tukey. Os dados que não exibiram distribuição normal, foram analisadas pelo teste de Kruskal–Wallis.

4. Resultados

4.1. Morfometria da Região Cefálica

Os embriões utilizados nesta análise apresentavam padrões morfológicos normais, tanto para sua idade de estagiamento (HH), quanto para possíveis alterações morfológicas externas.

Com relação a média da distância cefálica ântero posterior (medida 1), o grupo controle exibiu menor valor - 4,5 mm ($\pm 0,34$), e também apresentou diferenças significativas ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo AF e AF+Hcy que mostraram as maiores médias e mais similares entre si: 5,0 mm ($\pm 0,24$) e 4,9 mm ($\pm 0,19$), respectivamente (Figura 10 – A).

Na análise da medida da altura cefálica (medida 2), o grupo controle exibiu novamente a menor média - 4,9 mm ($\pm 0,33$) já os grupos Hcy e AF+Hcy revelaram médias superiores e semelhantes - 5,4 mm ($\pm 0,37$) e 5,3 mm ($\pm 0,20$) respectivamente, sendo que estes, diferiram estatisticamente do grupo controle ($p \leq 0,05$) (Figura 10 – B).

A média da distância ântero posterior do telencéfalo (medida 3) foi superior e igual nos grupos Hcy e AF+Hcy - 3,3 mm ($\pm 0,18$) que por sua vez exibiu diferenças estatísticas com o grupo controle, que apresentou a menor - 3,0 mm ($\pm 0,18$) ($p \leq 0,05$) (Figura 10 - C).

As médias referentes à altura do telencéfalo (medida 4) mostraram bastante similaridade, não havendo diferenças significativas entre o grupo controle - 1,1mm ($\pm 0,11$), AF - 1,0mm ($\pm 0,18$), Hcy - 1,1mm ($\pm 0,11$) e AF+Hcy - 1,1mm ($\pm 0,11$) (Figura 10 - D).

A análise morfométrica da distância ântero posterior do mesencéfalo (medida 5) conferiu ao grupo controle a menor média - 3,3 mm ($\pm 0,20$). Os grupos AF - 3,6 mm ($\pm 0,14$), Hcy - 3,6 mm ($\pm 0,26$) e AF+Hcy - 3,8 mm ($\pm 0,11$) exibiram médias superiores e semelhantes entre si quando comparadas ao grupo controle, havendo assim, diferenças significativas entre controle e os demais tratamentos ($p \leq 0,05$) (Figura 10 – E).

Em relação à altura do mesencéfalo (medida 6), o grupo Hcy exibiu a maior média - 2,0 mm ($\pm 0,37$), que foi semelhante ao grupo AF+Hcy - 1,9mm ($\pm 0,16$). Já o grupo controle apresentou a menor média - 1,5mm ($\pm 0,14$), e exibiu diferenças significativas com os grupos Hcy e AF+Hcy ($p \leq 0,05$) (Figura 10 - F).

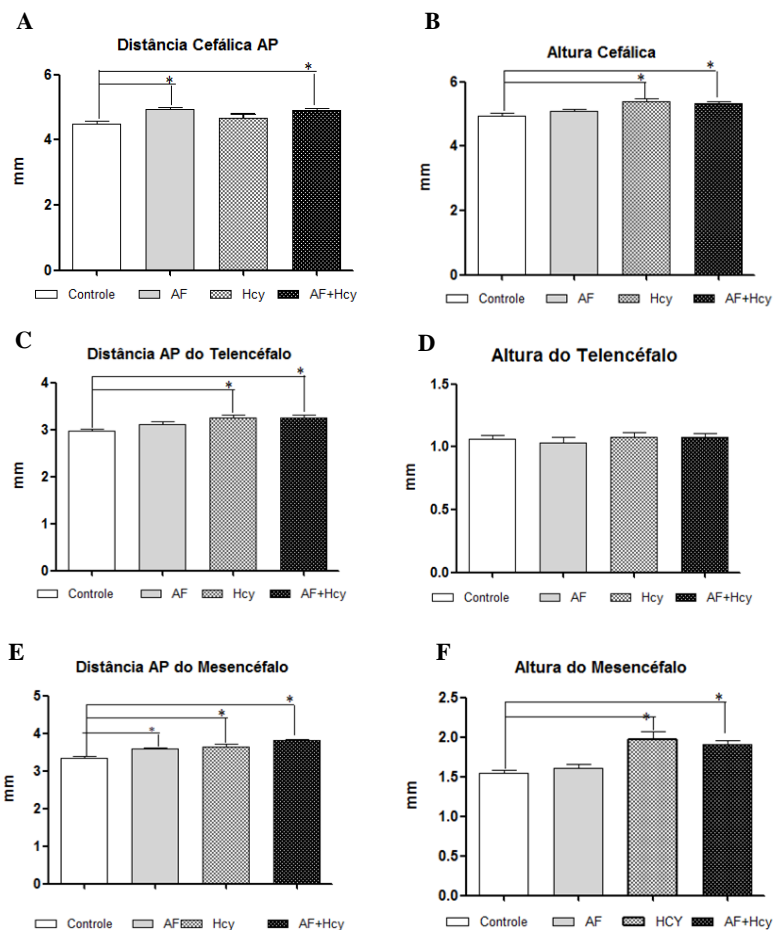


Figura 10: Análise morfométrica da região cefálica e das vesículas encefálicas dos embriões de *G. domesticus* em E6, submetidos aos diferentes grupos experimentais (n = 15 embriões/grupo). Dados apresentados em média \pm desvio padrão, (*) indica $p \leq 0,05$.

4.2. Microscopia do Telencéfalo

A análise dos cortes corados com HE não evidenciou alterações morfológicas no telencéfalo dos embriões em E6, submetidos aos diferentes tratamentos (Figura 11).

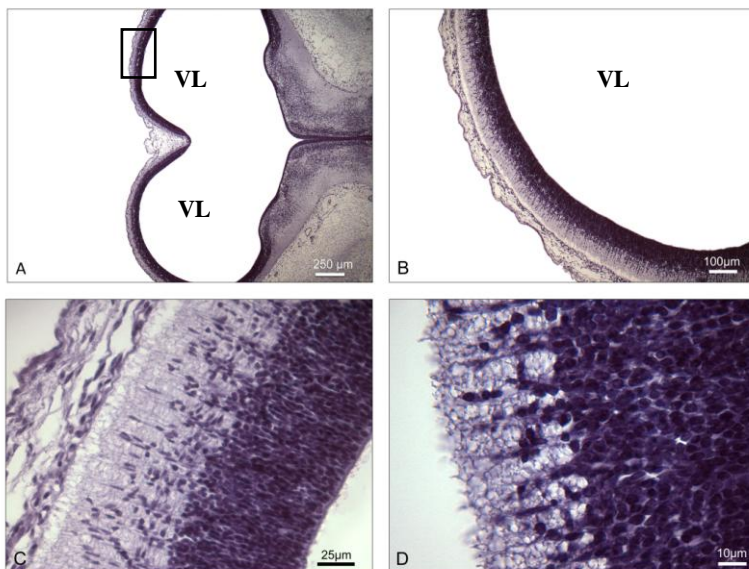


Figura 11: Cortes frontais de telencéfalo (6 μm) de embriões de *G. domesticus* em E6, submetidos aos diferentes grupos tratamentos. Coloração hematoxilina – eosina. (A) Vista geral do telencéfalo pertencente ao grupo controle. (B) Detalhe da região do telencéfalo lateral de um embrião tratado com AF e destacado em A. (C) Vista da região do telencéfalo lateral de embrião tratado com Hcy. (D) Detalhe da região do telencéfalo lateral de embrião tratado com ÁF + Hcy. (VL) Ventrículo Lateral.

4.3. Morfometria das camadas do telencéfalo

A morfometria das camadas celulares do telencéfalo foi realizada para verificar se havia diferença na organização tecidual entre os diferentes grupos experimentais. A camada endimária, assemelha-se ao neuroepitélio do tubo neural, constituído por células que darão origem aos neurônios e as células da glia. Em nossa análise, esta camada

exibiu a menor espessura quando comparada as outras camadas estudadas. Nesta camada, o grupo AF+Hcy apresentou a menor espessura - 10,58 μm ($\pm 2,53$), seguido do grupo controle - 11,82 μm ($\pm 2,38$), AF - 13,94 μm ($\pm 1,88$) e Hcy - 14,12 μm ($\pm 1,91$).

A camada do manto, a mais espessa e organizada, é constituída por alta densidade de corpos celulares de neurônios. Esta camada exibiu maior similaridade entre os valores de média, excetuando o grupo AF+Hcy que exibiu o menor valor - 67,52 μm ($\pm 14,7$) em comparação aos grupos: controle - 89,02 μm ($\pm 16,3$), AF - 89,19 μm ($\pm 17,2$) e Hcy - 90,61 μm ($\pm 20,6$). Neste caso, o grupo AF+Hcy exibiu diferenças significativas com os demais grupos.

A morfometria da camada marginal mostrou valores de média semelhantes entre os grupos controle - 47,86 μm ($\pm 15,2$), AF - 49,90 μm ($\pm 9,3$) e Hcy - 49,24 μm ($\pm 16,7$), já o grupo AF+Hcy exibiu o menor valor de média - 30,10 μm ($\pm 18,2$), sendo este o grupo experimental que exibiu diferenças significativas com os demais (Figura 12).

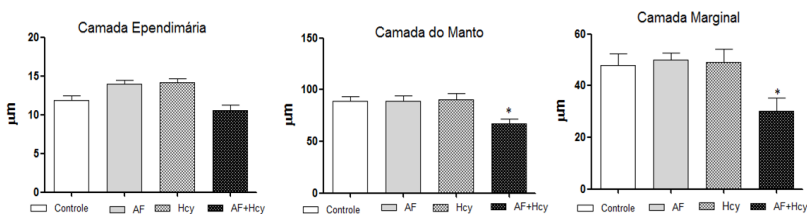


Figura 12: Análise morfométrica das camadas celulares que compõem o telencéfalo dos embriões de *G. domesticus* em E6, submetidos aos diferentes grupos experimentais (n = 12 embriões/grupo). Dados apresentados em média \pm desvio padrão, (*) indica $p \leq 0,05$.

4.3.1. Proliferação Celular

Células em divisão celular foram marcadas com anticorpo anti-fosfo-histona H3. Em todos os tratamentos foram observadas células positivas para este anticorpo, apenas na camada ependimária, como mostrado na figura 13.

No grupo controle os embriões apresentaram forte marcação para células em proliferação, em todo telencéfalo. Do mesmo modo, no grupo AF+Hcy, também houve predominância de células positivas na

mesma região. Já os embriões tratados com AF também demonstraram marcação positiva para fosfo-histona H3, entretanto esta marcação foi menor em relação ao número de células positivas e distribuía-se de forma mais espaçada ao longo de todo o telencéfalo.

A análise do grupo Hcy mostrou menor média em relação à densidade de células marcadas - $45,25 \text{ mm}^2 (\pm 3,62)$, (figura 10C) confirmando ao microscópio, poucas marcações no tecido telencefálico. Este grupo mostrou diferenças estatísticas significativas quando comparado ao grupo controle e AF+Hcy (Figura 14).

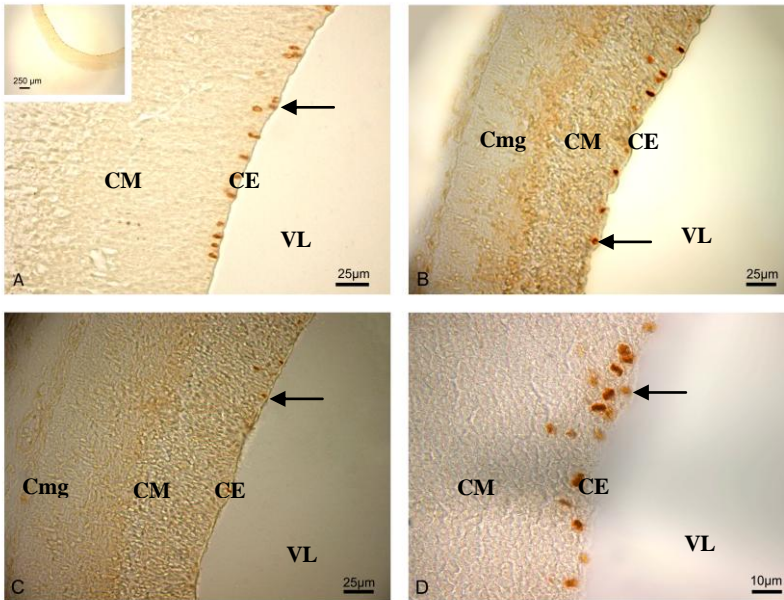


Figura 13: Cortes frontais de telencéfalo (6 μm) de embriões de *G. domesticus* em E6 submetidos à técnica de imuno-histoquímica com fosfo-histona H3. (A) Vista do telencéfalo lateral pertencente ao grupo controle mostrando grande densidade de células positivas distribuídas ao longo da camada ependimária. (B) Detalhe da região do telencéfalo lateral de um embrião tratado com AF, mostrando poucas células positivas para fosfo-histona H3. (C) Vista da região do telencéfalo lateral de embrião tratado com Hcy. As setas pretas mostram o reduzido número de células marcadas com fosfo-histona. (D) Detalhe da região do telencéfalo lateral de embrião tratado com AF+Hcy, revelando grande densidade de células marcadas. (CE) camada ependimária; (CM) camada do manto e (Cmg) camada marginal.

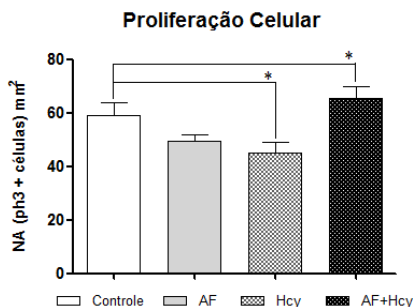


Figura 14: Densidade numérica de células positivas para fosfo-histona H3 em embriões de *G. domesticus* E6. (n = 5). Dados apresentados em média \pm desvio padrão, (*) indica $p \leq 0,05$.

4.3.2. Diferenciação Neuronal

Para verificar se o AF e a Hcy interferem na diferenciação dos neurônios do telencéfalo dos embriões, foi realizada a técnica de imunohistoquímica com anticorpo anti- β tubulina III. As células positivas para este marcador estavam localizadas nas camadas do manto e marginal, porém, em nenhum dos cortes analisados foi evidenciada marcação neuronal na camada endodimária.

Os embriões do grupo controle apresentaram intensa marcação nas camadas do manto e marginal, sendo que a densidade das células marcadas - $249,24 \text{ mm}^2 (\pm 117,9)$ que foi superior aos demais grupos. Os grupos, AF e AF+Hcy também apresentaram células positivas para β - tubulina III, entretanto, em menor quantidade quando comparada ao grupo controle, sendo que no grupo AF+Hcy estas marcações estavam mais localizadas na camada marginal. Já os embriões do grupo Hcy apresentaram as menores médias em relação à densidade de células marcadas com β -Tubulina III - $92,63 \text{ mm}^2 (\pm 49,18)$ (Figuras 15 e 16).

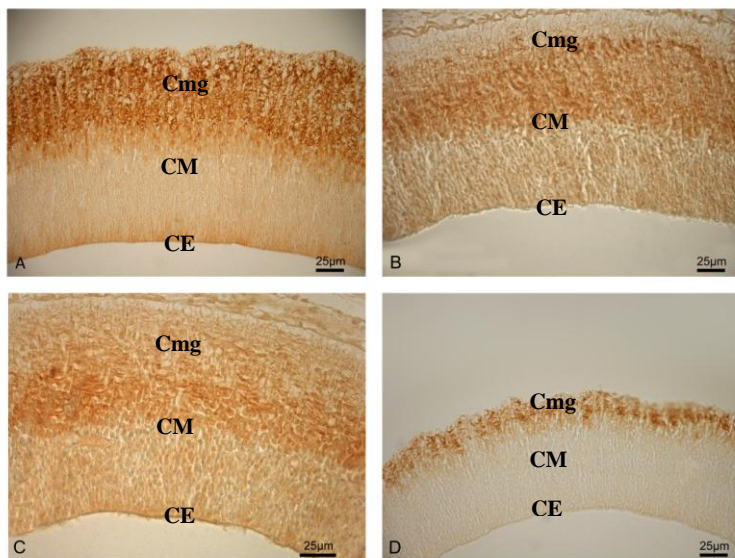


Figura 15: Cortes frontais de telencéfalo (6 μm) de embriões E6 submetidos à técnica de imuno-histoquímica com β Tubulina III. **(A)** Detalhe do telencéfalo lateral pertencente ao grupo controle mostrando grande densidade de células positivas distribuídas nas camadas do manto e marginal. **(B)** Detalhe da região do telencéfalo lateral de um embrião tratado com AF, mostrando células positivas para β Tubulina III nas camadas do manto e marginal. **(C)** Vista da região do telencéfalo lateral de embrião tratado com Hcy, mostrando marcação mais intensa na camada do manto. **(D)** Detalhe da região do telencéfalo lateral de embrião tratado com AF+Hcy, revelando grande densidade de células marcadas na camada marginal. **(CE)** camada ependimária; **(CM)** camada do manto e **(Cmg)** camada marginal.

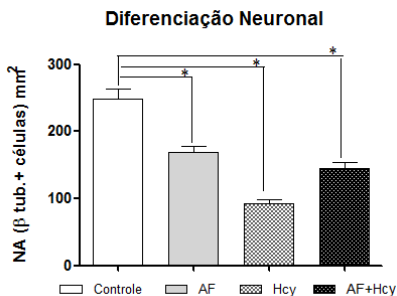


Figura 16: Densidade numérica de células positivas para β tubulina III em embriões de *G. domesticus* E6. (n = 5). Dados apresentados em média \pm desvio padrão, (*) indica $p \leq 0,05$.

4.3.3. Diferenciação Glial

A análise por imuno-histoquímica para diferenciação glial revelou marcação positiva em todos os tratamentos, porém com uma predominância maior no grupo Hcy, que exibiu maior média - 371,8 mm^2 (\pm 135,9). Neste grupo, as marcações estavam distribuídas principalmente por toda a extensão da camada do manto, no início da camada marginal parte da camada ependimária. Enquanto que nos demais tratamentos, as marcações positivas para diferenciação glial localizavam-se, sobretudo na periferia da camada do manto e início da camada marginal. (Figuras 17 e 18).

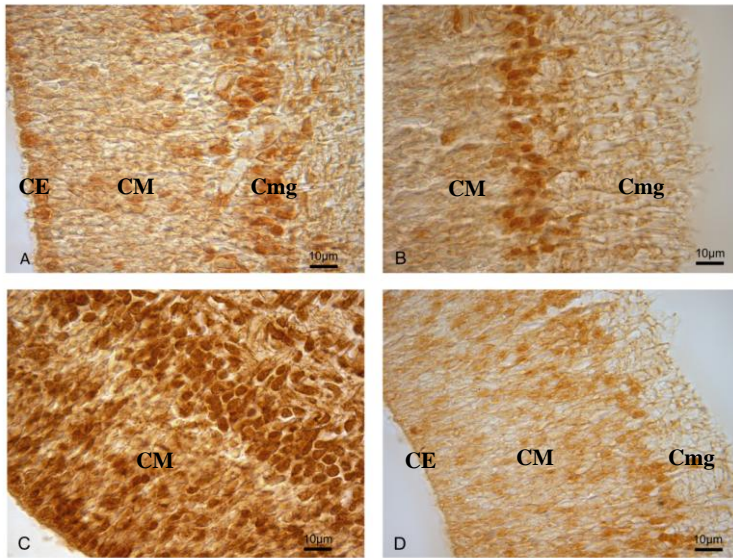


Figura 17: Cortes frontais de telencéfalo (6 μm) de embriões em E6 submetidos à técnica de imuno-histoquímica com GFAP. (A) Detalhe do telencéfalo lateral pertencente ao grupo controle mostrando células positivas distribuídas na camada do manto. (B) Detalhe da região do telencéfalo lateral de um embrião tratado com AF, mostrando marcação para GFAP na camada do manto. (C) Vista da região do telencéfalo lateral de embrião tratado com Hcy, mostrando marcação mais intensa por toda camada do manto. (D) Detalhe da região do telencéfalo lateral de embrião tratado com AF+Hcy, revelando pouca densidade de células positivas para GFAP. (CE) camada ependimária; (CM) camada do manto e (Cmg) camada marginal.

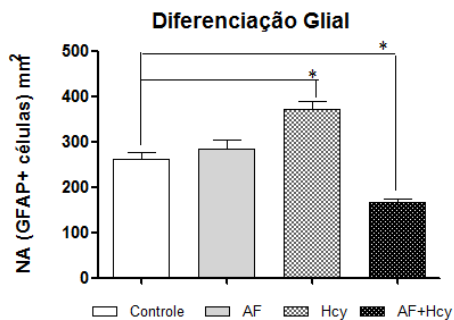


Figura 18: Densidade numérica de células positivas para GFAP em embriões de *G. domesticus* em E6. (n = 5). Dados apresentados em média \pm desvio padrão, (*) indica $p \leq 0,05$.

5. Discussão

No presente estudo, foram simuladas condições experimentais para investigar em *G. domesticus* o efeito de elevados níveis de Hcy durante o desenvolvimento embrionário até E6. Considerando que esta espécie eclode em E21, nosso estudo contempla o primeiro terço do desenvolvimento, quando os eventos da neurulação e fechamento do tubo neural já se completaram.

Dados da literatura demonstram a relação entre a deficiência de folatos, o consequente aumento dos níveis plasmáticos de Hcy e seu envolvimento com a ocorrência DTN, além de danos celulares reconhecidos principalmente *in vitro* (SMITHELLS, SHEPPARD et al., 1981; ROSENQUIST et al., 1996; VAN DER PUT, VAN STRAATEN et al., 2001; SACHDEV, 2005; VAN MIL, OOSTERBAAN et al., 2010). Embora estas relações sejam amplamente reportadas, no presente estudo, todos os embriões analisados exibiam morfologia externa normal para a idade embrionária analisada. Logo, os dados aqui discutidos nos trazem informações principalmente sobre a interferência do AF e da Hcy sobre os processos de proliferação e diferenciação neural.

Ao analisarmos os resultados referentes à morfometria da região cefálica e das vesículas encefálicas observamos pouca variação entre os tratamentos, o que reforça o reconhecimento das morfologias externas normais dos embriões estudados.

Em determinadas medidas, como a altura do telencéfalo, as médias mostraram-se muito semelhantes, com pouquíssima variação, o que mostra que não houve interferência das substâncias administradas no crescimento do telencéfalo. Em todas as medidas aqui consideradas, o grupo controle, exibiu a menor média, o que não era esperado, visto que este grupo não recebeu os tratamentos que supostamente interfeririam no desenvolvimento do SNC da espécie estudada. O trabalho de Kobus (2007) com embriões em E4 mostrou que, com a metade da dose de Hcy utilizada no presente estudo, houve um retardo no crescimento, já que reduziu quase todas as medidas cefálicas dos embriões tratados. Assim, pode-se sugerir que o padrão de medidas possa ser modificado, na medida em que o desenvolvimento prossegue.

Considerando os resultados obtidos para as morfometrias externas e considerando o padrão de organização das camadas celulares

das vesículas encefálicas em E6 (ependimária, manto e marginal), optou-se por analisar o efeito do AF e da Hcy no telencéfalo.

Primeiramente, investigou-se se os tratamentos utilizados estavam interferindo na organização e espessura das camadas do telencéfalo. Os dados de morfometria obtidos mostraram que os tratamentos com AF e a Hcy não alteram o padrão normal para o estágio de desenvolvimento analisado. Embora a distribuição celular nas camadas exibisse este padrão normal, os resultados das espessuras foram pouco esclarecedores. Novamente, o grupo Hcy exibiu as maiores espessuras em todas as camadas. Este resultado parece ser controverso, uma vez que elevados níveis de Hcy são reportados como prejudiciais ao SNC em desenvolvimento podendo ocasionar apoptose (MILLER JR et al., 2003), o que poderia reduzir a espessura da camada. O estudo de Lipton *et al.* (1997), demonstra que a apoptose induzida por elevados níveis de Hcy pode ocorrer pela estimulação do receptor *N-metil D-aspartato* (NMDA) e consequente liberação e aumento de $[Ca^{2+}]$ citoplasmáticos. Além disso, Bottiglieri (2005) demonstra que a Hcy pode induzir danos celulares, através da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), que provocam estresse oxidativo, que por sua vez, pode levar a apoptose. Em cultura de neurônios, a Hcy também provocou apoptose por quebra de DNA, ativação da via-caspase 3 e liberação de citocromo c para o citoplasma das células (VAN MIL, OOSTERBAAN et al., 2010).

Neste trabalho avaliamos também o efeito dos tratamentos sobre o mecanismo de proliferação celular. Todos os grupos estudados exibiram marcações positivas para fosfo-histona H3 na camada ependimária, o que era esperado, uma vez que apenas nessa camada há atividade proliferativa no desenvolvimento inicial do SNC (HYTTEL, SINOWATZ et al., 2012). Na camada ependimária estão localizadas as células precursoras dos neurônios e das células da glia. Tais células estão em constante divisão celular; e cada precursor conclui rapidamente as etapas do ciclo celular e origina células-filhas que ou recomeçam o ciclo ou migram para formar as camadas sucessivas a ependimária (LENT, 2005). O anticorpo anti-fosfo-histona H3 é empregado como marcador celular de proliferação, pois a histona H3 fosforilada é necessária ao processo de condensação da cromatina, logo as células que exibiram esta marcação, estavam em plena multiplicação (POLO e ALMOUZNI, 2005).

Através da utilização de marcadores mitóticos (fosfo-histona H3), estudo realizado com ratas grávidas, mostrou que a alimentação materna, deficiente em AF, provocou diminuição da proliferação celular dos progenitores neurais no telencéfalo de seus filhotes (CRACIUNESCU et al., 2004), neste caso, o folato é essencial para a síntese de ácidos nucleicos, através da biossíntese de purina e timidina que são necessárias para a divisão celular (BAILEY e GREGORY, 1999). Este mesmo padrão destacado anteriormente, mas em medula de embriões de aves foi encontrado por Kobus et al (2013), onde novamente a Hcy diminuiu a proliferação celular no tecido neural.

A diferenciação neuronal foi evidenciada com marcação com anticorpo anti- β -tubulina III. Esta proteína pertence a um grupo de proteínas do citoesqueleto que proporciona aos neurônios mobilidade, principalmente durante o período de migração, manutenção da morfologia e motilidade das suas organelas internas. A β -tubulina corresponde a um dos oito isótopos desta proteína identificado em mamíferos e aves. Dentre estes, o subtipo III, é predominantemente encontrado no cérebro, sendo amplamente utilizado como marcador para neurônios maduros (BRADY, COLMAN et al., 2009).

Células positivas para β -tubulina III foram visualizadas em todos os tratamentos, com predominância de marcação na camada do manto e marginal, mas nunca na camada endimária. Estudos realizados em ratos forneceram subsídios para estabelecer este padrão de distribuição dos neurônios nas respectivas camadas. Em estudos clássicos de proliferação celular, através de marcações com timidina- H^3 foi possível estabelecer a gênese dos neurônios conforme o padrão mencionado anteriormente. Os neuroblastos presentes no neuroepitélio dão origem a neurônios que diferenciam e migraram para formar a camada do manto, e posteriormente a camada marginal (SIDMAN et al., 1959). Assim as marcações para o fenótipo neuronal, aparecem somente após a diferenciação dos neuroblastos em neurônios, e isto é evidenciado nas camadas do manto e marginal.

Nossos resultados mostram que os embriões tratados com Hcy apresentaram os menores valores de média em relação à densidade de células- β -Tubulina III positivas. Além disto, a marcação para β -Tubulina III estava localizada apenas na camada do manto, o que pode sugerir que a Hcy retardou a migração neuronal em direção a camada marginal. Uma possível relação entre Hcy e migração celular, implica na participação da molécula de adesão celular (NCAM, do inglês - *the*

neural cell adhesion molecule). Esta molécula, que no cérebro é expressa por neurônios e em menor quantidade por células da glia, promove a adesão celular homofílica por meio da afinidade com a NCAM de outra célula (RØNN et al., 1998). Esta interação celular via NCAM, auxilia os neurônios migrantes na formação das camadas laminares do cérebro (HATTEN, 1999). Como relatado no início desta discussão, a Hcy atua como antagonista do receptor NMDA, que é o principal regulador de migração e adesão celular (VAN MIL, OOSTERBAAN et al., 2010), o que nos leva a crer que em nossos experimentos, a Hcy retardou a migração dos neurônios juvenis. Segundo trabalho de Kobus et al., (2009), a homocisteína prove a diminui a expressão de NCAM, porém na medula espinhal.

A análise da diferenciação glial foi realizada utilizando anticorpo anti-GFAP como marcador. Em todos os tratamentos foi evidenciada a marcação positiva para GFAP. Este resultado já era esperado, visto que a proteína fibrilar ácida é a principal proteína dos filamentos intermediários de astrócitos maduros presentes SNC (ENG, GHIRNIKAR et al., 2000). Os astrócitos atuam como suporte neuronal e desempenham papéis importantes na manutenção da função do cérebro (LAMING et al., 2000). Além dos astrócitos, foi demonstrado em primatas que as células da glia radial originadas do neuroepitélio também expressam GFAP (CAMPBELL e GÖTZ, 2002).

Dentre os tratamentos que exibiram marcação positiva para GFAP, o grupo tratado com Hcy, apresentou a maior média de células marcadas, o que resultou em diferenças significativas com os demais tratamentos. Além da predominância das marcações, as células GFAP⁺ estavam presentes nas três camadas do telencéfalo dos embriões tratados com Hcy, camada endimária, ao longo da camada do manto e início da camada marginal. Os astrócitos são capazes de responder a danos causados ao SNC. Em resposta a substâncias tóxicas, por exemplo, estas células da glia proliferam, e alteram sua morfologia, há também o aumento das proteínas do citoesqueleto, principalmente GFAP. Esta condição específica é conhecida como gliose reativa (astrogliose) (PITANGA et al., 2012), e pode variar em intensidade dependendo do dano causado (SOFRONIEW e VINTERS, 2010).

Assim como demonstrado em nossos resultados, células imunorreativas ao anticorpo anti-GFAP na camada endimária também foram demonstradas nos estudos de Sarnat (1992). Em estudo realizado em humanos, a GFAP foi encontrada em células endimárias em

desenvolvimento, mas não em um período posterior (mais maduro). Levando a crer, que sua presença parece estar relacionada com o grau de diferenciação da camada endodérmica (ROESSMANN et al., 1980).

Os demais tratamentos, controle, AF e AF+Hcy apresentaram médias menores para células-GFAP positivas. Neste caso, o grupo controle se assemelhou ao AF, o que já era esperado, e o tratamento AF+Hcy mostrou a menor média para células-GFAP positivas. Segundo Sofroniew e Vinters (2010), apesar do uso da GFAP como marcador astrocitário ser bem estabelecido e amplamente utilizado em técnicas de imuno-histoquímica, a expressão desta proteína pelos astrócitos pode exibir variabilidade de local, além do que, a GFAP não está distribuída por todo o citoplasma do astrócito, e pode estar ausente nos processos finamente ramificados. Deste modo, os autores sugerem futuramente utilizar um novo candidato como marcador - a proteína Aldh1L1, cuja identificação por imuno-histoquímica é mais sensível para a maioria, se não todos os astrócitos em tecido saudável.

Por fim, neste trabalho realizamos ainda a análise dos embriões tratados com AF+Hcy, com o intuito de testar se o AF administrado previamente seria capaz de exercer sua função neuroprotetora contra o elevado índice de Hcy induzida. Porém, em nossos resultados não encontramos este padrão. Nas análises realizadas, este grupo demonstrou muitas vezes os valores mais discrepantes, e também não exibiu nenhum tipo de padrão; hora apresentava valores muito baixos, hora demonstrava médias superiores a todos os grupos. Embora saibamos que o AF possui um efeito benéfico ao SNC em desenvolvimento e que a Hcy em concentrações elevadas possui efeitos danosos, esta combinação administrada nos embriões de *G. domesticus* em idade embrionária de E1 e E2 mostrou-se inconclusiva.

Em resumo, nossos dados demonstraram principalmente que o tratamento com Hcy induziu a uma diminuição na proliferação celular, expressão da β tubulina III e um aumento na expressão de GFAP no telencéfalo de embriões de *G. domesticus* em E6.

6. Considerações Finais

- Os tratamentos administrados na idade de E1 e E2, não interferiram no crescimento e desenvolvimento das vesículas encefálicas, fato este comprovado pela pouca variação no tamanho destas estruturas nos embriões em E6;
- As espessuras das camadas do telencéfalo, também nesta idade embrionária, não apresentaram alterações tanto na sua organização, quanto no tamanho da camada;
- A Hcy administrada diminuiu a proliferação celular da camada ependimária,
- A diferenciação neuronal mostrou-se prejudicada com a administração da Hcy, sendo que esta substância pode ter retardado a migração destas células;
- O tratamento com Hcy induziu uma superexpressão de GFAP, o que caracteriza a condição de gliose reativa, que geralmente está presente em casos de dano ao tecido.

7. Referências

AFMAN, L. A. et al. Inhibition of transmethylation disturbs neurulation in chick embryos. **Developmental Brain Research**, v. 158, n. 1-2, p. 59-65, 2005.

ALBERTS, B. **Fundamentos da biologia celular**. 2. Porto Alegre: Ed. Artmed, 2006.

ALVAREZ-BUYLLA, A. et al. A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 2, n. 4, p. 287-293, 2001.

ASHFIELD-WATT, P. A. L. et al. Folate, homocysteine, endothelial function and cardiovascular disease. What is the link? **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 55, n. 8, p. 425-433, 2001.

BAILEY, L. B.; GREGORY, J. F. Folate Metabolism and Requirements. **The Journal of Nutrition**, v. 129, n. 4, p. 779-782, 1999.

BARRES, B. A. The Mystery and Magic of Glia: A Perspective on Their Roles in Health and Disease. **Neuron**, v. 60, n. 3, p. 430-440, 2008.

BELLAIRS, R.; OSMOND, M. **Atlas of Chick Development**. 2. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005. 470

BLACK, R. E. Micronutrients in pregnancy. **British Journal of Nutrition** v. 85, n. 2, p. 193-197, 2001.

BOTTIGLIERI, T. Homocysteine and folate metabolism in depression. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 29, n. 7, p. 1103-1112, 2005.

BRADY, S. et al. 2 - Subcellular Organization of the Nervous System: Organelles and Their Functions. In: (Ed.). **From Molecules to Networks: An Introduction to Cellular and Molecular Neuroscience**. 2. San Diego: Elsevier Academic Press, 2009. p.19-48.

BRASIL. Guia alimentar para a população brasileira: Promovendo a alimentação saudável. Brasília: Ministério da Saúde, 2005. 236

BRAUER, P. R.; TIERNEY, B. J. Consequences of elevated homocysteine during embryonic development and possible modes of action. **Current pharmaceutical design**, v. 10, n. 22, p. 2719-2732, 2004.

BRODY, T. 9 - Vitamins. In: (Ed.). **Nutritional Biochemistry (Second Edition)**. San Diego: Academic Press, 1999. p.491-692. ISBN 978-0-12-134836-6.

CAMPBELL, K.; GÖTZ, M. Radial glia: multi-purpose cells for vertebrate brain development. **Trends in Neurosciences**, v. 25, n. 5, p. 235-238, 2002.

CARLSON, B. M. **Human Embriology and Developmental Biology**. St. Louis: Mosby, 1994.

COLAS, J-F.; SCHOENWOLF, G. C. Towards a cellular and molecular understanding of neurulation. **Developmental Dynamics**, v. 221, n. 2, p. 117-145, 2001.

CRACIUNESCU, C. N. et al. Folic Acid Deficiency During Late Gestation Decreases Progenitor Cell Proliferation and Increases Apoptosis in Fetal Mouse Brain. **The Journal of Nutrition**, v. 134, n. 1, p. 162-166, 2004.

CUSKELLY, G. J. et al. Effect of increasing dietary folate on red-cell folate: implications for prevention of neural tube defects. **The Lancet**, v. 347, n. 9002, p. 657-659, 1996.

DE LA CALLE, M. et al. Homocysteine, folic acid and B-group vitamins in obstetrics and gynaecology. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 107, n. 2, p. 125-134, 2003.

DJUKIC, A. Folate-Responsive Neurologic Diseases. **Pediatric Neurology**, v. 37, n. 6, p. 387-397, 2007.

ENG, L. et al. Glial Fibrillary Acidic Protein: GFAP-Thirty-One Years (1969–2000). **Neurochemical Research**, v. 25, n. 9-10, p. 1439-1451, 2000.

FINKELSTEIN, J. D. Homocysteine: a history in progress. **Nutrition review**, v. 58, n. 7, p. 193-204, 2000.

GARCÍA-MARÍN, V. et al. Cajal's contributions to glia research. **Trends in Neurosciences**, v. 30, n. 9, p. 479-487, 2007.

GARCIA, S. M. L. et al. **Embriologia**. Porto Alegre: Artes Medicas, 1991.

GILBERT, S. F. **Developmental Biology**. 9. Sunderland: Sinauer Associates, 2010. 711

GOMES, F. C. et al. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): modulation by growth factors and its implication in astrocyte differentiation. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** v. 32, n. 5, p. 619-631, 1999.

GOMES, F. C. A. et al. Glia: dos velhos conceitos às novas funções de hoje e as que ainda virão. **Estudos Avançados**, v. 27, n. 77, p. 61-84, 2013.

GOZES, I. Tubulin in the nervous system. **Neurochemistry International**, v. 4, n. 2–3, p. 101-120, 1982.

HAIDER, B. A.; BHUTTA, Z. A. Multiple-micronutrient supplementation for women during pregnancy. **Cochrane Database of Systematic Reviews** n. 4, 2006.

HAMBURGER, V.; HAMILTON, H. L. A series of normal stages in the development of the chick embryo. **Journal of Morphology**, v. 88, n. 1, p. 49-92, 1951.

HATTEN, M. E. CENTRAL NERVOUS SYSTEM NEURONAL MIGRATION. **Annual Review of Neuroscience**, v. 22, n. 1, p. 511-539, 1999.

HO, P. I. et al. Multiple aspects of homocysteine neurotoxicity: Glutamate excitotoxicity, kinase hyperactivation and DNA damage. **Journal of Neuroscience Research**, v. 70, n. 5, p. 694-702, 2002.

HOF, P. R. et al. 1 - Cellular Components of Nervous Tissue. In: (Ed.). **From Molecules to Networks: An Introduction Cellular and Molecular Neuroscience**. San Diego: Elsevier Academic Press, 2009. p.1-18.

HOUILLON, C. **Embriologia**. São Paulo: Edgar Bulcher, 1972.

HYTTEL, P. et al. **Embriologia Veterinária**. 1. Elsevier, 2012. 472

KATSETOS, C. D. et al. Class III beta-tubulin isotype: a key cytoskeletal protein at the crossroads of developmental neurobiology and tumor neuropathology. **Journal of child neurology**, v. 18, n. 12, p. 851-66; discussion 867, 2003.

KIERSZENBAUM, A. L. **Histologia e Biologia Celular: Uma Introdução à Patologia**. 2. Rio de janeiro: Elsevier, 2008. 677

KOBUS, K. **Ação da Homocisteína e do Ácido Fólico sobre o Padrão Morfológico e Estrutura Organizacional do Telencéfalo e Medula Espinhal de Embriões de Gallus Domesticus**. 2007. Dissertação (Mestrado em Neurociências), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

KOBUS, K. et al. Homocysteine causes disruptions in spinal cord morphology and changes the expression of Pax 1/9 and Sox 9 gene products in the axial mesenchyme. **Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology**, v. 97, n. 6, p. 386-397, 2013.

KOBUS, K. et al. Effects of folic acid and homocysteine on spinal cord morphology of the chicken embryo. **Histochemistry and cell biology**, v. 132, n. 5, p. 525-532, 2009.

KOLB, B.; WHISHAW, I. Q. **Neurociência do comportamento**. Barueri: Manole, 2002.

KRIEGSTEIN, A. R.; GOTZ, M. Radial glia diversity: a matter of cell fate. **Glia**, v. 43, n. 1, p. 37-43, 2003.

KRISHNASWAMY, K.; NAIR, K. M. Importance of folate in human nutrition. **British Journal of Nutrition**, v. 85, n. SupplementS2, p. S115-S124, 2001.

LAMING, P. R. et al. Neuronal–glial interactions and behaviour. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 24, n. 3, p. 295-340, 2000.

LENT, R. **Cem bilhões de neurônios: conceitos fundamentais de neurociência**. São Paulo: Atheneu, 2005.

LUCOCK, M. Folic Acid: Nutritional Biochemistry, Molecular Biology, and Role in Disease Processes. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 71, n. 1–2, p. 121-138, 2000.

MACHADO, G.; FIGUEIREDO, F. Revisão: filamentos Intermediários. v. 29, 1996.

MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Stereological tools in biomedical research. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 75, p. 469-486, 2003.

MATTSON, M. P.; SHEA, T. B. Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. **Trends in Neurosciences**, v. 26, n. 3, p. 137-146, 2003.

MILLER, A. The Methylation, Neurotransmitter, and Antioxidant Connections Between Folate and Depression. **Alternative Medicine Review**, v. 13, n. 3, 2008.

MILLER JR, R. R. et al. Homocysteine-induced changes in brain membrane composition correlate with increased brain caspase-3 activities and reduced chick embryo viability. **Comparative**

Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, v. 136, n. 3, p. 521-532, 2003.

MONTGOMERY, D. L. Astrocytes: Form, Functions, and Roles in Disease. **Veterinary Pathology Online**, v. 31, n. 2, p. 145-167, 1994.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. **Embriologia Clínica**. 8. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 552

O'RAHILY, R.; MÜLLER, F. Neurulation in the normal human embryo. In: (Ed.). **Neural Tube defects**. England: Bristish Library Catalouing, v.181, 1994. p.70-89.

OBEID, R.; HERRMANN, W. Mechanisms of homocysteine neurotoxicity in neurodegenerative diseases with special reference to dementia. **FEBS Letters**, v. 580, n. 13, p. 2994-3005, 2006.

PITANGA, B. P. S. et al. The role of astrocytes in metabolism and neurotoxicity of the pyrrolizidine alkaloid monocrotaline, the main toxin of *Crotalaria retusa*. **Frontiers in Pharmacology**, v. 3, 2012.

POLO, S. E.; ALMOUZNI, G. Histone metabolic pathways and chromatin assembly factors as proliferation markers. **Cancer Letters**, v. 220, n. 1, p. 1-9, 2005.

RAKIC, P.; SWAAB, D. F. Defects of neuronal migration and the pathogenesis of cortical malformations. In: G.J. BOER, M. G. P. F. M. M. D. F. S. e HAAREN, F. V. (Ed.). **Progress in Brain Research**: Elsevier, v. Volume 73, 1988. p.15-37. ISBN 0079-6123.

REDIES, C. Cadherins in the central nervous system. **Progress in Neurobiology**, v. 61, n. 6, p. 611-648, 2000.

ROESSMANN, U. et al. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) in ependymal cells during development. An immunocytochemical study. **Brain Research**, v. 200, n. 1, p. 13-21, 1980.

RØNN, L. C. B. et al. The neural cell adhesion molecule (NCAM) in development and plasticity of the nervous system. **Experimental Gerontology**, v. 33, n. 7-8, p. 853-864, 1998.

ROSENQUIST, T. H. et al. Homocysteine induces congenital defects of the heart and neural tube: Effect of folic acid. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 26, p. 15227-15232, 1996.

SACHDEV, P. S. Homocysteine and brain atrophy. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 29, n. 7, p. 1152-1161, 2005.

SALLET, P. C. Prêmio Nobel: dinamite, neurociências e outras ironias. **Revista de Psiquiatria Clínica**, v. 36, n. 1, p. 37-40, 2009.

SCHOENWOLF, G. C. 28 - The Avian Embryo: A Model for Descriptive and Experimental Embryology. In: SALLY, A. M. (Ed.). **Cell Lineage and Fate Determination**. San Diego: Academic Press, 1999. p.429-436. ISBN 978-0-12-505255-9.

SCHOENWOLF, G. C. et al. **Larsen Embriologia Humana**. 4. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

SHAPIRO, L.; COLMAN, D. R. Structural biology of cadherins in the nervous system. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 8, n. 5, p. 593-599, 1998.

SIDMAN, R. L. et al. Cell proliferation and migration in the primitive ependymal zone; An autoradiographic study of histogenesis in the nervous system. **Experimental Neurology**, v. 1, n. 4, p. 322-333, 1959.

SMITHELLS, R. W. et al. Vitamin deficiencies and neural tube defects. **Archives of Disease in Childhood**, v. 51, n. 12, p. 944-950, 1976.

SMITHELLS, R. W. et al. Apparent prevention of neural tube defects by periconceptional vitamin supplementation. **Arch Dis Child.**, v. 56, n. 12, p. 911-918, 1981.

SOBEIH, M. M.; CORFAS, G. Extracellular factors that regulate neuronal migration in the central nervous system. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 20, n. 3–5, p. 349-357, 2002.

SOFRONIEW, M.; VINTERS, H. Astrocytes: biology and pathology. **Acta Neuropathologica**, v. 119, n. 1, p. 7-35, 2010.

VAN DER PUT, N. M. J. et al. Folate, homocysteine and neural tube defects: An overview. **Experimental Biology and Medicine**, v. 226, n. 4, p. 243-270, 2001.

VAN MIL, N. H. et al. Teratogenicity and underlying mechanisms of homocysteine in animal models: A review. **Reproductive Toxicology**, v. 30, n. 4, p. 520-531, 2010.

WOLPERT, L. Much more from the chicken's egg than breakfast – a wonderful model system. **Mechanisms of Development**, v. 121, n. 9, p. 1015-1017, 2004.

WOLPERT, L. et al. **Principles of development**. 2. New York: Oxford University, 2002.

ZHU, H. et al. Homocysteine remethylation enzyme polymorphisms and increased risks for neural tube defects. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 78, n. 3, p. 216-221, 2003.